



PO/EP 97 / 03670

09/214679

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
CONFÉDÉRATION SUISSE
CONFEDERAZIONE SVIZZERA

REC'D 23 SEP 1997

WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT

Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein überein. Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein spécifiée à la page suivante. La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux Etats.

Attestazione

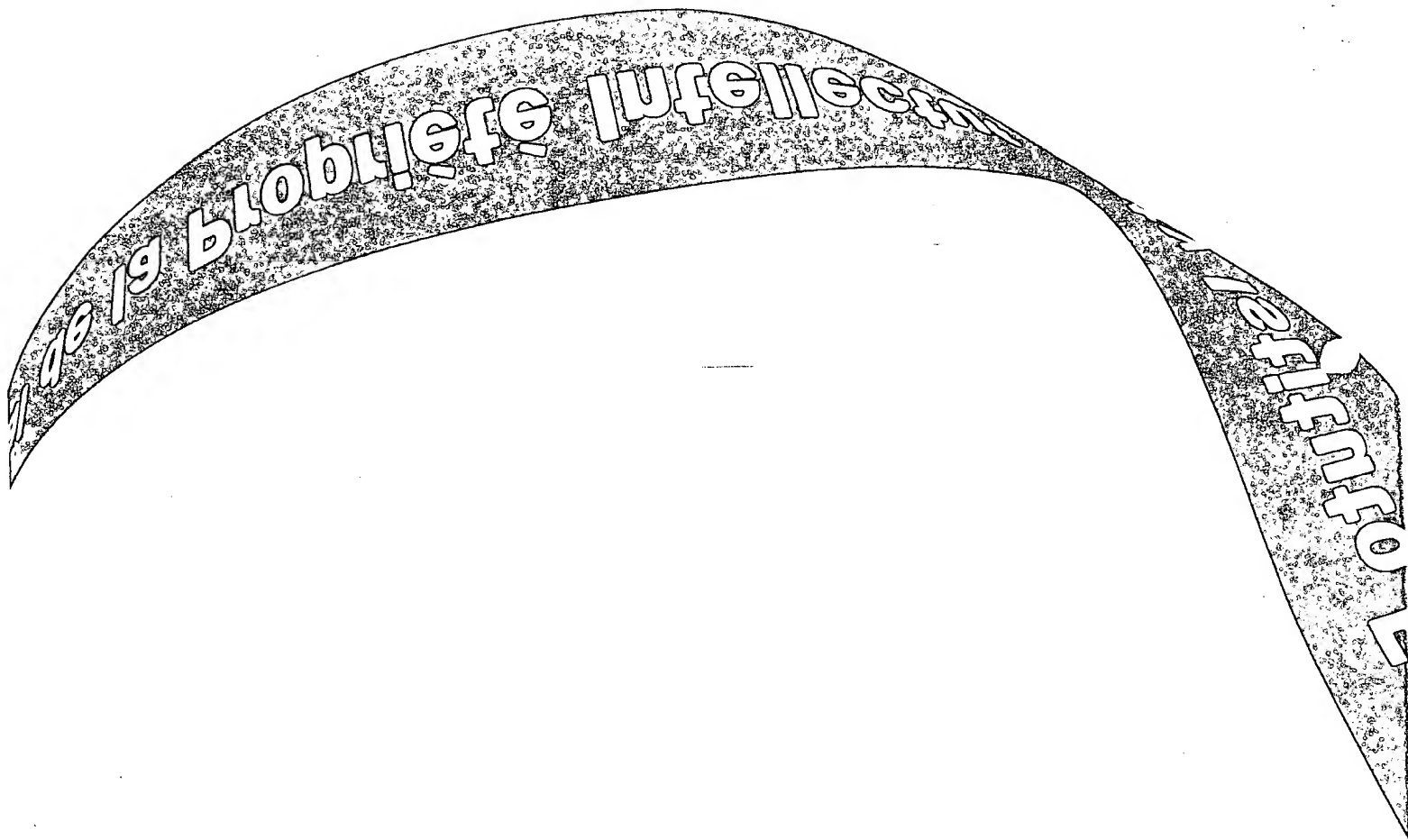
Gli uniti documenti sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein specificata nella pagina seguente. La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

Bern, 23. Mai 1997

Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum
Institut Fédéral de la Propriété Intellectuelle
Istituto Federale della Proprietà Intellettuale

Patentgesuche
Demandes de brevet
Domande di brevetto

U. Kohler



Patentgesuch Nr. 1997 0500/97

HINTERLEGUNGSBESCHEINIGUNG (Art. 46 Abs. 5 PatV)

Das Eidgenössische Institut für Geistiges Eigentum bescheinigt den Eingang des unten näher bezeichneten schweizerischen Patentgesuches.

Titel:
Verfahren zur Herstellung von (S)- oder
(R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure.

Patentbewerber:
Lonza AG, Gampel/Wallis. Geschäftsleitung
4002 Basel

Anmeldedatum: 03.03.1997

Voraussichtliche Klassen: C07C, C12P

Unveränderliches Exemplar
Exemplaire Invariable
Esemplare Inmutabile

L.P.: 1736, Schweiz - Erstanmeldung
Patentgesuch Nr.: vom

LONZA AG

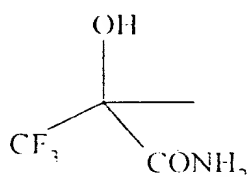
Gampel / Wallis

(Geschäftsleitung: Basel)

Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methyl-
propionsäure

Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure sowie neue Mikroorganismen, die befähigt sind das Propionsäureamid der Formel



VI

in Form des Racemats oder seiner optisch aktiven Isomere als einzige Stickstoffquelle zu verwerten.

(S)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure ist ein wichtiges Zwischenprodukt zur Herstellung von therapeutischen Amiden (EP-A 0 524 781).

Gemäss J. Chem. Soc., 1951, S. 2329 wird ein Verfahren zur Herstellung von (S)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure beschrieben, bei dem das entsprechende Racemat mittels Dimethoxystrychnin in das gewünschte S-Enantiomere überführt wird. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass das für die Racemattrennung eingesetzte Dimethoxystrychnin zu kostspielig ist.

Die EP-A 0 524 781 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von (S)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure bei dem das entsprechende Racemat mittels (S)-(-)- α -methylbenzylamin in das gewünschte S-Enantiomere überführt wird. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass grosse Mengen an (S)-(-)- α -methylbenzylamin eingesetzt werden müssen, womit dieses Verfahren ebenfalls zu kostspielig ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, sowohl ein kostengünstiges und technisch gangbares Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure zur Verfügung zu stellen als auch Mikroorganismen bereit zu stellen, die in diesem Verfahren eingesetzt werden.

5

Diese Aufgabe wird mit den Mikroorganismen gemäss Anspruch 1 und mit dem Verfahren gemäss Anspruch 5 gelöst.

- Die erfindungsgemässen Mikroorganismen können aus Bodenproben, Schlamm oder Abwasser unter Zuhilfenahme üblicher mikrobiologischer Techniken isoliert werden. Erfindungsgemäss erfolgt die Isolation derart, dass man diese in einem Medium enthaltend das Propionsäureamid der Formel VI in Form des Racemats oder eines seiner optisch aktiven Isomere als einzige Stickstoffquelle mit einer geeigneten Kohlenstoffquelle auf übliche Weise züchtet. Aus der durch Züchtung erhaltenen Kultur werden dann jene selektioniert, die stabil sind und das Propionsäureamid der Formel VI als einzige Stickstoffquelle verwerten.

- Als geeignete Kohlenstoffquellen können die Mikroorganismen Zucker, Zuckeralkohole oder Carbonsäuren als Wachstumssubstrat nützen. Als Zucker können z. B. Glucose, Arabinose, Rhamnose, Lactose oder Maltose verwendet werden. Als Zuckeralkohole können bspw. Sorbit, Mannit oder Glycerin verwendet werden. Als Carbonsäure kann beispielsweise Citronensäure verwendet werden. Vorzugsweise wird als Kohlenstoffquelle Glycerin oder Glucose eingesetzt.

- Als Selektions- und Anzuchtmedium können die in der Fachwelt üblichen verwendet werden, wie beispielsweise ein Mineralsalzmedium gemäss Kulla et al., Arch. Microbiol. 135, S. 1 - 7, 1983.

Während der Anzucht und Selektion werden zweckmässig die wirksamen Enzyme der Mikroorganismen induziert. Als Enzyminduktor kann das Propionsäureamid der Formel VI in Form des Racemats oder eines seiner optisch aktiven Isomere, Acetamid oder Malonsäurediamid, verwendet werden.

5

Üblicherweise erfolgt die Anzucht und Selektion bei einer Temperatur von 0 bis 42 °C, vorzugsweise von 20 bis 37 °C und bei einem pH-Wert von 4 bis 9, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 5 bis 8.

- 10 Bevorzugte Mikroorganismen sind Propionsäureamid (Formel VI) verwertende der Gattung *Klebsiella*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus* und *Pseudomonas*. Insbesondere werden Mikroorganismen der Spezies *Klebsiella oxytoca* (DSM 11009), *Pseudomonas* sp. (DSM 11010), *Rhodococcus opacus* ID-622 (DSM 11344), *Arthrobacter ramosus* ID-620 (DSM 11350), *Bacillus* sp. ID-621 (DSM 11351), *Klebsiella planticola* ID-624 (DSM
- 15 11354) und *Klebsiella pneumoniae* ID-625 (DSM 11355) sowie deren funktionelle äquivalente Varianten und Mutanten, isoliert. Dabei weisen die Mikroorganismen *Klebsiella oxytoca* (DSM 11009), *Klebsiella planticola* ID-624 (DSM 11354) und *Klebsiella pneumoniae* ID-625 (DSM 11355) R-Hydrolase-Aktivität und die Mikroorganismen *Pseudomonas* sp. (DSM 11010), *Rhodococcus opacus* ID-622 (DSM 11344), *Arthrobacter*
- 20 *ramosus* ID-620 (DSM 11350) und *Bacillus* sp. ID-621 (DSM 11351) S-Hydrolase-Aktivität auf. Die Mikroorganismen mit der Bezeichnung DSM 11010, DSM 11009 wurden am 24.06.1996, die Mikroorganismen mit der Bezeichnung DSM 11355, DSM 11354 am 27.12.1996 und die Mikroorganismen mit der Bezeichnung DSM 11351, DSM 11350 und DSM 11344 am 13.12.1996 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zell-
- 25 kulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-38124 Braunschweig, gemäss Budapester Vertrag hinterlegt.

Unter „funktionell äquivalenten Varianten und Mutanten“ werden Mikroorganismen verstanden, die im wesentlichen dieselben Eigenschaften und Funktionen wie die

- 30 Ursprungsmikroorganismen besitzen. Derartige Varianten und Mutanten können zufällig, z. B. durch UV-Bestrahlung gebildet werden.

Taxonomische Beschreibung von *Klebsiella oxytoca* (DSM 11009)

Zellform	Stäbchen
Breite μm	1.0 - 1.2
Länge μm	1.2 - 2.0
Beweglichkeit	—
Gram-Reaktion	—
Lyse durch 3% KOH	+
Aminopeptidase (Cerny)	+
Sporen	—
Oxidase	—
Catalase	+
Wachstum anaerob	+
Gas aus Glucose	+
Säure aus (ASS)	
Glucose	+
Fructose	+
Xylose	+
Erythrit	—
Adonit	+
D-Mannose	+
L-Rhamnose	+
Inosit	+
Sorbit	+
α -Methyl-D-glucosid	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Lactose	+
D-Arabitol	+
ONPG	+
ADH	—
LDC	w
ODC	—
VP	—

Indol	+
H ₂ S-Bildung	-
Simmons Citrat	+
Urease	+
Methylrot	-
Hydrolyse von	
Gelatine	-
DNA	-
Tween 80	-

Taxonomische Beschreibung von *Pseudomonas* sp. (DSM 11010)

Zellform	Stäbchen
Breite µm	0.7 - 0.8
Länge µm	1.5 - 3.5
Beweglichkeit	+
Gram-Reaktion	-
Lyse durch 3% KOH	+
Aminopeptidase (Cerny)	+
Sporen	-
Oxidase	+
Fluoreszens	+
Catalase	+
Wachstum bei 41 °C	-
ADH	++
Urease	-
Hydrolyse von Gelatine	++
Nitratreduktion	-

Denitrifikation	-
Levan aus Saccharose	+
Lecithinase	+
Substratverwertung	
Adipat	-
Citrat	+
Malat	+
L-Mandelat	-
Phenylacetat	-
D-Glucose	+
Maltose	-
Trehalose	+
Mannitol	+
Adonitol	+
Acetamid	+
Hippurat	-
Tryptamin	-
Butylamin	-

Abkürzungen:

ASS: Acetylsalicylsäure

ONPG: O-Nitro-phenylgalactosidase

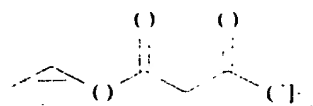
ADH: Alkoholdehydrogenase

LDC: Lactatdecarboxylase

ODC: Ornithindecaboxylase

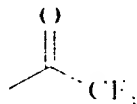
VP: Voges Proskauer

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure wird in der ersten Stufe derart durchgeführt, dass man Ethyl-4,4,4-trifluoroacetoacetat der Formel



III

mit einer Mineralsäure in Trifluoraceton der Formel



IV

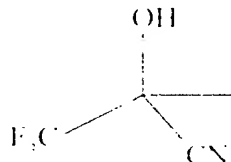
überführt.

Als Mineralsäure kann beispielsweise Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure oder Phosphorsäure verwendet werden. Vorzugsweise wird Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Salpetersäure, insbesondere Schwefelsäure, verwendet.

- 5 Zweckmässig wird die Umsetzung in der ersten Stufe in einem polar protischen Lösungsmittel wie z. B. in einem niederen Alkohol, in Wasser oder in einer niederen Alkohol-Wasser-Mischung durchgeführt. Als niederer Alkohol kann beispielsweise Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, Butanol, Tert.-butanol oder Isobutanol eingesetzt werden.
- 10 Die Umsetzung in der ersten Stufe wird zweckmässig bei einer Temperatur von 50 bis 100 °C, vorzugsweise bei einer Temperatur von 70 bis 95 °C, durchgeführt.

In der zweiten Stufe des erfindungsgemässen Verfahrens wird Trifluoraceton (Formel IV) mit einem Cyanid in das Propionsäurenitril der Formel

15



V

umgesetzt.

- 20 Zweckmässig wird als Cyanid ein Alkalimetallcyanid wie Natrium- oder Kaliumcyanid, vorzugsweise Natriumcyanid, eingesetzt.

Die Umsetzung in der zweiten Stufe wird zweckmässig in Gegenwart einer Mineralsäure durchgeführt. Als Mineralsäure können die gleichen wie die zuvor beschriebenen

- 25 verwendet werden. Vorzugsweise wird als Mineralsäure Schwefelsäure eingesetzt. Üblicherweise wird die Mineralsäure im Überschuss bezogen auf Trifluoraceton eingesetzt. Vorzugsweise werden von 1 bis 10 mol Mineralsäure pro mol Trifluoraceton verwendet.

Als Lösungsmittel können die gleichen wie die in der ersten Stufe verwendet werden.

Zweckmässig wird die zweite Stufe bei einer Temperatur von -20 bis 100 °C, vorzugsweise von 0 bis 20 °C durchgeführt.

5

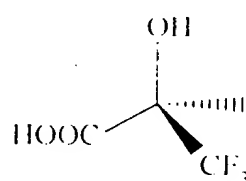
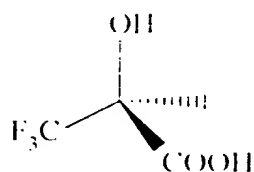
In der dritten Stufe des erfindungsgemässen Verfahrens wird das Propionsäurenitril der Formel V in einer konzentrierten Mineralsäure in das Propionsäureamid der Formel VI überführt.

- 10 Als Mineralsäuren können die gleichen wie die in der ersten und zweiten Stufe eingesetzt werden. Unter einer „konzentrierten Mineralsäure“ wird im folgenden eine 30 bis 100%ige Mineralsäure verstanden. Zweckmässig wird in der dritten Stufe eine 75 bis 100%ige, vorzugsweise eine 90 bis 100%ige Mineralsäure verwendet.

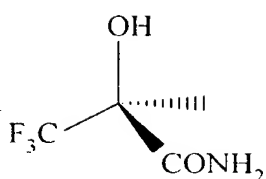
- 15 Die Umsetzung in der dritten Stufe wird zweckmässig bei einer Temperatur von 0 bis 160 °C, vorzugsweise von 70 bis 120 °C, durchgeführt.

In der vierten Stufe des erfindungsgemässen Verfahrens wird das Propionsäureamid der Formel VI mittels Mikroorganismen in die (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure der Formeln

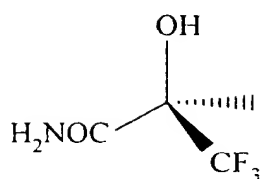
20



- überführt. Bei dieser Biotransformation fällt neben der (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure das (R)- oder (S)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid der Formeln
- 25



VII



VIII

an, das gegebenenfalls isoliert wird.

- 5 Das (R)- und (S)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid sind in der Literatur noch nicht beschriebene Verbindungen und daher als neue Zwischenprodukte zur Herstellung der (R)- oder (S)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure Bestandteil der Erfindung.
- 10 Prinzipiell ist die Biotransformation mit allen Mikroorganismen möglich, die das Propionsäureamid der Formel VI in Form des Racemats oder seiner optisch aktiven Isomere als einzige Stickstoffquelle verwerten. Für das Verfahren besonders geeignet sind Mikroorganismen der Gattung Klebsiella, Rhodococcus, Arthrobacter, Bacillus oder Pseudomonas, insbesondere der Spezies Klebsiella oxytoca (DSM 11009), Rhodococcus opacus ID-622 (DSM 11344), Arthrobacter ramosus ID-620 (DSM 11350), Bacillus sp. ID-621 (DSM 11351), Klebsiella planticola ID-624 (DSM 11354), Klebsiella pneumoniae ID-625 (DSM 11355) und Pseudomonas sp. (DSM 11010), sowie deren funktionell äquivalente Varianten und Mutanten.
- 15
- 20 Die Biotransformation kann nach üblichem Anzüchten der Mikroorganismen mit ruhenden Zellen (nicht wachsende Zellen, die keine Kohlenstoff- und Energiequelle mehr benötigen) oder mit wachsenden Zellen durchgeführt werden. Vorzugsweise wird die Biotransformation mit ruhenden Zellen durchgeführt.
- 25 Für die Biotransformation können fachmännisch übliche Medien eingesetzt werden, wie bspw. niedermolare Phosphat-Puffer, HEPES-Puffer oder das zuvor beschriebene Mineralsalzmedium.

Zweckmässig wird die Biotransformation unter einmaliger oder kontinuierlicher Zugabe vom Propionsäureamid (Formel VI) so durchgeführt, dass die Konzentration 20 Gew.%, vorzugsweise 10 Gew.% nicht übersteigt.

- 5 Der pH-Wert des Mediums kann in einem Bereich von 4 bis 10, vorzugsweise von 5 bis 9,5 liegen. Zweckmässig wird die Biotransformation bei einer Temperatur von 10 bis 60 °C, vorzugsweise von 20 bis 40 °C, durchgeführt.

- 10 Die auf diese Weise erhaltene (S)- oder (R)- 3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure bzw. das (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid kann durch übliche Aufarbeitungsmethoden wie z. B. durch Extraktion isoliert werden.

- 15 Gegebenenfalls wird das (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid in Gegenwart einer Base zur entsprechenden Säure hydrolysiert. Als Base kann ein Alkalimetallhydroxid eingesetzt werden. Als Alkalimetallhydroxid wird zweckmässig Natrium- oder Kaliumhydroxid eingesetzt.

Beispiel 1**Herstellung von Trifluoraceton**

500 g (4.9 Mol) konzentrierte Schwefelsäure (96%ig; Merck) wurden zu 1 l destilliertem
5 Wasser gegeben und das Ganze auf 73 °C erhitzt. Dann wurden 500 g (2.69 Mol) Ethyl-
4,4,4-trifluoracetoacetat langsam hinzugefügt wobei sich zwei Phasen bildeten. Der
Reaktionsansatz wurde bis zur Rückflusstemperatur erhitzt und das dabei gebildete
Trifluoraceton abdestilliert. Nach 2 h wurden 293.8 g Trifluoraceton als farblose
Flüssigkeit, entsprechend einer Ausbeute von ca. 90%, isoliert. Die GC-Analyse zeigte eine
10 Reinheit von 92.1 %.

Beispiel 2**Herstellung von 3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure**

15 39.4 g Natriumcyanid (0.763 Mol) wurden zu 174 ml destilliertem Wasser hinzugegeben
und das Ganze auf -1 °C gekühlt. Anschliessend wurden 100 g Trifluoraceton (0.822 Mol)
tropfenweise hinzugefügt, wobei sich das Reaktionsgemisch auf 6 °C erwärmte. Nach
Beendigung der Trifluoraceton-Zugabe wurden bei 4 - 5 °C 293.4 g 6 N Schwefelsäure
20 (1.4916 mol H⁺) hinzugegeben. Danach wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei
Raumtemperatur gerührt. Anschliessend wurde mit Ethylether oder mit tert. Butyl-
methylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden entweder unter
Normaldruck bei 32 °C oder unter leichtem Vakuum (300 - 120 mbar) destilliert.
Insgesamt wurden 88 g Produkt mit einer Reinheit von 91.2 % (gemessen mittels GC).
25 entsprechend einer Ausbeute von 75.6 %, erhalten.

Beispiel 3**Herstellung von 3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid**

Unter Argon-Atmosphäre wurde 98 %ige Schwefelsäure vorgelegt. Dazu wurden 15 g
 5 2-Hydroxy-2',2',2'-trifluormethylpropionsäurenitril (86,9 % gemäss GC) hinzugefügt und
 die Reaktion wurde auf 95 °C erhitzt. Nach Edukt-Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für
 15 min auf 114 °C erhitzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch auf 5 °C abgekühlt, wobei
 sich eine dicke braune Lösung bildete. Anschliessend wurden 40 g destilliertes Wasser
 tropfenweise hinzugegeben. Dabei sollte sich das Reaktionsgemisch nicht über 15 °C
 10 erwärmen. Die dabei gebildete gelbliche Suspension wurde 15 min lang auf -15 °C
 abgekühlt und dann filtriert. Der Filterkuchen wurde mit 20 ml eiskaltem Wasser
 gewaschen und dann im Vakuum getrocknet. Dabei wurden 12,64 g leicht gelbliches Roh-
 Produkt erhalten. Anschliessend wurde das Roh-Produkt in 13 ml Ethylacetat zum
 Rückfluss erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu dieser Suspension wurden
 15 15 ml Hexan hinzugegeben und das Ganze auf 0 °C abgekühlt. Danach wurde nochmals
 mit Hexan gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wurden 11,8 g Produkt, entsprechend
 einer Ausbeute von 80,2 %, erhalten.

Schmp.: 143,1 - 144,3 °C

Beispiel 4

**Herstellung von (S)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid ((S)-2,2-
 HTFMPA) und (R)- 3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure ((R)-2,2-
 25 HTFMPS) mittels eines Mikroorganismus mit einer R-Hydrolase**

4.1. Selektion und Isolation von Mikroorganismen mit R- und S-Amidase-Aktivität

Zu 10 g Bodenprobe wurde 100 ml Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,0) hinzugeben und das
 30 Ganze 10 Minuten stehen gelassen und filtriert. Danach wurde der Überstand (5,0 ml) oder
 1 ml Abwasser (ARA, Visp) in ein Mineralsalzmedium (25 ml; Kulla et al., Arch.

Microbiol. 135. S. 1 - 7, 1983) überimpft, welches Glycerin und R,S-HTFMMPA (Kohlenstoff-/Stickstoff-Verhältnis 5:1) enthielt. Anschliessend wurde diese Kultur inkubiert, bis eine Mischkultur entstanden war, die R-(-)- oder S-(+)-2,2-HTFMMPA als einzige Stickstoff-Quelle benutzen kann. Diese Kultur wurde dann mehrmals überimpft und bei 30 °C bebrütet bis eine Mischkultur entstanden war.

Die Reinkultur dieser Mikroorganismen wurde unter Zuhilfenahme traditioneller mikrobiologischer Techniken erhalten.

Die auf diese Weise erhaltenen Mikroorganismenstämmen wurden dann auf Agar-Platten für ihr Wachstum auf R,S-2,2-HTFMMPA getestet. Die positiven Stämme wurden weiter getestet. Mit diesen Stämmen wurde dann ein Vorkultur-Medium angeimpft. Die in dieser Vorkultur enthaltenen Mikroorganismen wurden ins Mineralsalzmedium überführt und dann auf ihre Fähigkeit überprüft, selektiv R-(-)-2,2-HTFMMPA oder S-(+)-2,2-HTFMMPA als einzige Stickstoff-Quelle zu nutzen, wobei der Überstand mittels GC auf die Bildung von R-(-)-2,2-HTFMPS oder S-(+)-2,2-HTFMPS und auf die Anreicherung der entsprechenden Amid geprüft wurde.

4.2. Aktivitätsbestimmung der R-(-)- oder S-(+)-2,2-HTFMMPA-Hydrolase

Zur Aktivitätsbestimmung der Hydrolasen wurde die Mikroorganismensuspension auf eine optische Dichte von 4.0 bei 650 nm eingestellt. Als Medium diente ein Phosphat-Puffer (100 mmolar), pH 7.0, mit 0.5 Gew.% R,S-HTFMMPA. Diese Suspension wurde 2 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Das durch die Hydrolase freigesetzte NH_4^+ oder das entsprechende HTFMMPA wurde mittels GC gemessen und die Aktivität als g R-(-)- oder S-(+)-HTFMMPA umgesetzt/l/h/optische Dichte bei 650 nm ausgedrückt, vorausgesetzt, dass 1 mmol gebildetes NH_4^+ = 1 mmol umgesetztem HTFMMPA entspricht.

Tabelle 1: Die Hydrolase-Aktivität von Klebsiella und Pseudomonas

Stamm	Hydrolase-Aktivität	
	R-spezifische (g/l/h/o.D. 650 nm)	S-spezifische (g/l/h/o.D. 650 nm)
DSM 11009 (<i>Klebsiella sp.</i>)	0,11	-
DSM 11010 (<i>Pseudomonas sp.</i>)	-	0,09

4.3. Herstellung von S-(+)-2,2-HTFMPA und R-(-)-2,2-HTFMPS.

- 5 *Klebsiella oxytoca* (DSM 11009), *Klebsiella planticola* ID-624 (DSM 11354) oder *Klebsiella pneumoniae* ID-625 (DSM 11355) wurden auf Mineralsalzmedium-Agar-Platte mit Glycerin als Kohlenstoff-Quelle und (RS)-2,2-HTFMPA als einzige Stickstoff-Quelle 2 Tage lang bei 30 °C bebrütet. Die Zusammensetzung des Mineralsalzmediums ist in Kulla et al., Arch. Microbiol., 135, S. 1 - 7, 1983 beschrieben. Mit diesen ausplattierten
- 10 Mikroorganismen wurde ein Vorkultur-Medium mit der gleichen Zusammensetzung beimpft und 2 Tag lang bei 30 °C inkubiert.

Das gleiche Mineralsalzmedium (600 ml) wurde mit 50 ml Vorkultur zur Induktion und Biomassen-Produktion beimpft und bei 30 °C 21 h lang inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,0

- 15 aufgenommen.

Nach Resuspension der Zellen in 0,1M Phosphat Puffer (200 ml, pH 7,0) wurde ein optische Dichte bei 650 nm von 4,3 eingestellt und 1,0 Gew.% (RS)-2,2-HTFMPA zugefügt. Nach einer Inkubation von ca. 20 h bei 30 °C wurde R-(-)-2,2-HTFMPA vollständig zur entsprechenden Säure umgesetzt, was einer optischer Reinheit (ee) von

- 20 100% und einer Ausbeute von 48%.

Der Reaktionsablauf wurde anhand der NH_4^+ -Freisetzung und anhand von GC-Analyse des Überstandes.

4.4. Herstellung von (S)-2,2-HTFMPS und (R)-2,2-HTFMPS mittels eines Mikroorganismus mit einer S-Hydrolase

In analoger Weise zu Beispiel 4.1. wurde der Mikroorganismen *Pseudomonas* sp. (DSM 11010), *Rhodococcus opacus* ID-622 (DSM 11344), *Arthrobacter ramosus* ID-620 (DSM 11350) und *Bacillus* sp. ID-621 (DSM 11351) isoliert. Die Induktionsdauer betrug 2 Tage unter ansonst gleichen Bedingungen wie Beispiel 4.3..

Im Gegensatz zu Beispiel 4.3. wurde die Biotransformation bei diesen Mikroorganismen mit 0.5 Gew.% R,S-2,2-HTFMPS durchgeführt. Der Stamm *Pseudomonas* sp. (DSM 11010) besitzt eine S-spezifische Hydrolase und die Aktivität der Hydrolase wurde zu 0.09 g S-(+)-2,2-HTFMPS umgesetzt/l/h/O.D. 650 nm bestimmt.

4.5. Aufarbeitung von S-(+)-2,2-HTFMPS und R-(-)-2,2-HTFMPS

196 ml einer Reaktionsmischung enthaltend S-(+)-2,2-HTFMPS und R-(-)-2,2-HTFMPS (erhalten aus Beispiel 4.3) 0.1 M Phosphatpuffer (250 ml), pH 10, wurden 3 mal mit Ethylacetat (200 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und dann bei 40 °C und 50 mbar eingedampft. Auf diese Weise wurden 912 mg feuchtes Produkt erhalten. Dieses wurde in heissem Ethylacetat (1.3 ml) gelöst und die Lösung dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von Hexan (2 ml) fiel das Produkt aus. Die Mischung wurde auf 0 °C abgekühlt, das Produkt filtriert und dann im Vakuum bei 50 °C getrocknet. Dabei wurden 791 mg des S-(+)-2,2-HTFMPS erhalten, entsprechend einer Ausbeute von 78.2 % bez. der halben eingesetzten Menge. Mittels chiraler GC-Analyse wurde nur das S-Isomere identifiziert.

Die verbleibende Wasserphase wurde mit konz. HCl auf pH 1 eingestellt und dann 2 mal mit Ethylacetat (200 ml) extrahiert. Die Extrakte wurden bei 40 °C eingedampft und dann getrocknet. Dann wurde 1 ml Toluol hinzugegeben und das Ganze auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurden nochmals 2 ml Hexan hinzugegeben und das Ganze auf 0 °C gekühlt. Der Feststoff wurde 2 - 3 mal mit Hexan gewaschen und dann getrocknet. Insgesamt wurden aus der Wasserphase nach Trocknen im Vakuum bei 35 °C 664 mg R-(-)-2,2-

HTFMPS erhalten, entsprechend einer Ausbeute von 65.7 % bez. der halben eingesetzten Menge. Mittels chiraler GC-Analyse wurde nur das R-Isomere identifiziert.

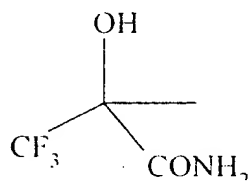
5 Beispiel 5

Chemische Hydrolyse von (S)-2,2-HTFMPA zu (S)-2,2-HTFMPS

0.47 g Natriumhydroxid (11.6 mMol) wurden in 5 ml destilliertes Wasser gegeben. Hierzu wurden 650 mg (4.14 mMol) (S)-2,2-HTFMPA hinzugefügt und das Ganze auf Rückfluss-
10 temperatur erhitzt. Nach 2 h wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt und der pH mit 10%iger HCl auf pH 1.0 eingestellt. Anschliessend wurde die Mischung 2 mal mit Ethylacetat (10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und bei maximal 40 °C eingedampft. Nach Trocknen im
15 Vakuum-Ofen (45 min bei 35 °C) wurden 618 mg (S)-(+)-2,2-HTFMPS, entsprechend einer Ausbeute von 94.4 %, erhalten. Mittels chiraler GC-Analyse wurde nur das eine Isomere identifiziert.

Patentansprüche

1. Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, dass sie befähigt sind, das Propionsäureamid der Formel

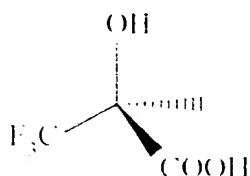


VI

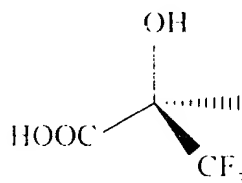
in Form des Racemats oder seiner optisch aktiven Isomere als einzige Stickstoffquelle zu verwerten.

2. Mikroorganismen nach Anspruch 1 der Gattung *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella* oder *Pseudomonas*.
3. Mikroorganismen nach Anspruch 2 der Spezies *Klebsiella oxytoca* (DSM 11009), *Rhodococcus opacus* ID-622 (DSM 11344), *Arthrobacter ramosus* ID-620 (DSM 11350), *Bacillus* sp. ID-621 (DSM 11351), *Klebsiella planticola* ID-624 (DSM 11354), *Klebsiella pneumoniae* ID-625 (DSM 11355) oder der Spezies *Pseudomonas* sp. (DSM 11010) oder deren funktionell äquivalente Varianten und Mutanten.

4. Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure der Formeln

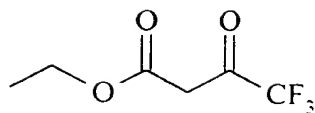


I



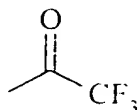
II

dadurch gekennzeichnet, dass man in der ersten Stufe Ethyl-4,4,4-trifluoracetoacetat der Formel



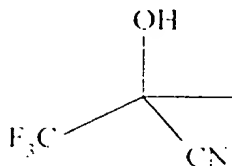
III

mit einer Mineralsäure in Trifluoraceton der Formel



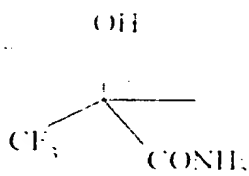
IV

überführt, dieses in der zweiten Stufe mit einem Cyanid in das Propionsäurenitril der Formel



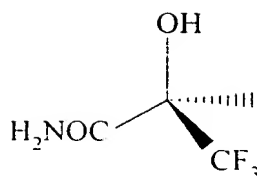
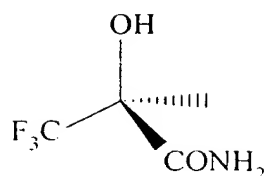
V

überführt, dieses in der dritten Stufe mit einer konzentrierten Mineralsäure in das Propionsäureamid der Formel



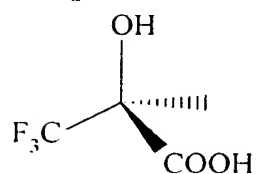
VI

überführt und dieses dann in der vierten Stufe mit einem Mikroorganismus gemäss den Ansprüchen 1 bis 3 in die (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure gemäss Formel I oder II umsetzt, dieses isoliert, wobei bei der Biotransformation neben der (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure das (R)- oder (S)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid der Formeln



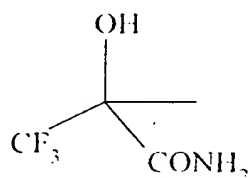
anfällt, welches gegebenenfalls isoliert wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man in der ersten und dritten Stufe als Mineralsäure Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Salpetersäure verwendet.
- 10 6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass man in der zweiten Stufe als Cyanid ein Alkalimetallcyanid verwendet.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung in der vierten Stufe mittels Mikroorganismen der Gattung Klebsiella, Rhodococcus, Arthrobacter, Bacillus oder Pseudomonas durchführt.
- 15 8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung in der vierten Stufe mittels Mikroorganismen der Spezies Klebsiella oxytoca (DSM 11009), Rhodococcus opacus ID-622 (DSM 11344), Arthrobacter ramosus ID-620 (DSM 11350), Bacillus sp. ID-621 (DSM 11351), Klebsiella planticola ID-624 (DSM 11354), Klebsiella pneumoniae ID-625 (DSM 11355) oder mittels Mikroorganismen der Spezies Pseudomonas sp. (DSM 11010) sowie mit deren funktionell äquivalenten Varianten und Mutanten durchführt.
- 20 9. Verfahren zur Herstellung von (S)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure, der Formel



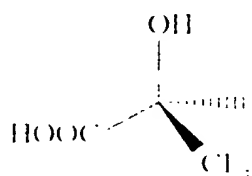
I

dadurch gekennzeichnet, dass man das Propionsäureamid der Formel



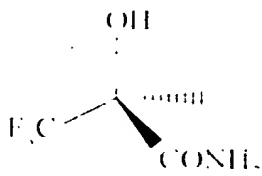
VI

mittels den Mikroorganismen gemäss den Ansprüchen 1 bis 3 in die (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure der Formel



II

überführt, wobei das (S)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid der Formel



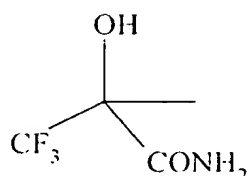
VII

anfällt und letzteres in Gegenwart einer Base zum Endprodukt gemäss Formel I hydrolysiert.

10. (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid.
11. (S)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid.

Zusammenfassung:

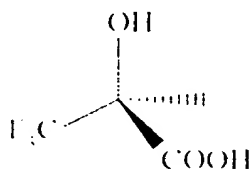
Beschrieben werden neue Mikroorganismen, die befähigt sind, das Propionsäureamid der Formel



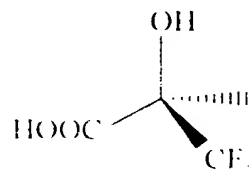
VI

in Form des Racemats oder seiner optisch aktiven Isomere als einzige Stickstoffquelle zu verwerten.

- 10 Desweiteren wird ein Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure der Formel



I



II

- 15 ausgehend von Ethyl-4,4,4-trifluoroacetat, beschrieben. Die ersten drei Verfahrensstufen werden chemisch, die vierte Verfahrensstufe wird mikrobiologisch durchgeführt.

20

25 Basel, 03. März 1997

IRLP / Dr. G. Schillinger / jf

